

CYTOCHIMIE. — *Localisation ultrastructurale du cytochrome c, dans l'ovocyte d'Artemia salina, par la 3,3'-diaminobenzidine à pH 9.* Note (*) de M. **Frank Roels**, transmise par M. Albert Dalcq.

Le cytochrome *c* et la cytochrome *c* oxydase interviennent dans la réaction mitochondriale à la diaminobenzidine à pH 9.

En 1968, Seligman, Karnovsky, Wasserkrug et J. S. Hanker ⁽¹⁾ ont introduit la réaction à la diaminobenzidine (DAB) à pH 7,4, pour la démonstration de la cytochrome-oxydase : ils ont obtenu un précipité osmiophile à l'intérieur des crêtes et de l'enveloppe des mitochondries. Récemment Karnovsky et Rice ⁽²⁾ ont suggéré que ce précipité serait dû à l'action peroxydasique du cytochrome *c*. D'autre part, Novikoff et Goldfischer ⁽³⁾ ont appliqué une incubation à la DAB à pH 6 et en présence de H₂O₂ ; le précipité sur les membranes des crêtes et sur les deux feuillet de l'enveloppe est interprété comme reflétant l'action des cytochromes *c* et *b*₅ ⁽⁴⁾. Pourtant Beard et Novikoff [⁽⁵⁾, ⁽⁶⁾] rapportent que l'addition de cytochrome *c* au milieu augmente fortement la réaction mitochondriale ; ce fait nous semble démontrer également que le cytochrome *c* lui-même ne précipite pas la DAB du milieu d'incubation, dans leurs conditions expérimentales. Hirai ⁽⁷⁾, de son côté, n'a pas obtenu de précipité quelconque après plus de 3 h d'incubation à pH 7,2 dans une solution fraîche de DAB ; selon lui, seules les solutions préalablement oxydées à l'air donnent une coloration mitochondriale, qu'il attribue à une réaction non enzymatique.

Nous avons étudié, aux microscopes optique et électronique, le précipité mitochondrial dans l'ovocyte d'*Artemia salina*, après incubation dans le milieu à la DAB (Sigma) de Novikoff et Goldfischer à pH 9 ⁽⁴⁾, mais sans addition de H₂O₂. Des ovaires et des œufs furent fixés au glutaraldéhyde distillé, à 2 % et tamponné à pH 7,5, pendant 50 mn et sur glace ; ils furent ensuite lavés au saccharose à 11 % et incubés à 37° ; après un lavage au tampon ils furent postfixés avec OsO₄ dans le tampon de Millonig pendant 1 h 1/2. L'inclusion s'est faite à l'« Epon », et les coupes fines furent examinées à l'« Elmiskop IA ».

Après 15 mn d'incubation le précipité osmiophile est clairement visible sur la membrane qui forme les crêtes ; le feuillet interne de l'enveloppe ne réagit que légèrement avec la DAB. Le feuillet externe est parfois visible dans des coupes non colorées, mais il s'agit là de l'osmiophilie normale. Quand la durée de l'incubation est augmentée, l'espace à l'intérieur des crêtes se remplit peu à peu de précipité (fig. 1).

Cette réaction mitochondriale est due à l'intervention d'une oxydase, puisqu'elle possède les caractéristiques suivantes :

- a. Elle est négative lorsque l'incubation se fait sous azote ;
- b. Elle n'est guère influencée par un excès de catalase purifiée (Boehringer, 0,5 mg/ml), et elle est par contre inhibée partiellement par l'addition de H₂O₂ à 0,03 % ;

c. Elle ne résiste pas à 90° pendant 10 mn ⁽⁸⁾ tandis que l'action peroxydasique du cytochrome *c* est plutôt augmentée dans ces conditions [⁽⁹⁾, ⁽¹⁰⁾] et observations personnelles].

Les deux propriétés suivantes rendent de plus très vraisemblable qu'il s'agit en fait de la cytochrome *c* oxydase :

a. La réaction mitochondriale est totalement inhibée par le KCN à 10^{-3} M [⁽¹¹⁾, ⁽¹²⁾, ⁽¹³⁾], et cet effet est irréversible ⁽¹⁴⁾ ;

b. Le NaN_3 à $5 \cdot 10^{-2}$ M ajouté au milieu d'incubation rend la réaction totalement négative ⁽¹³⁾.

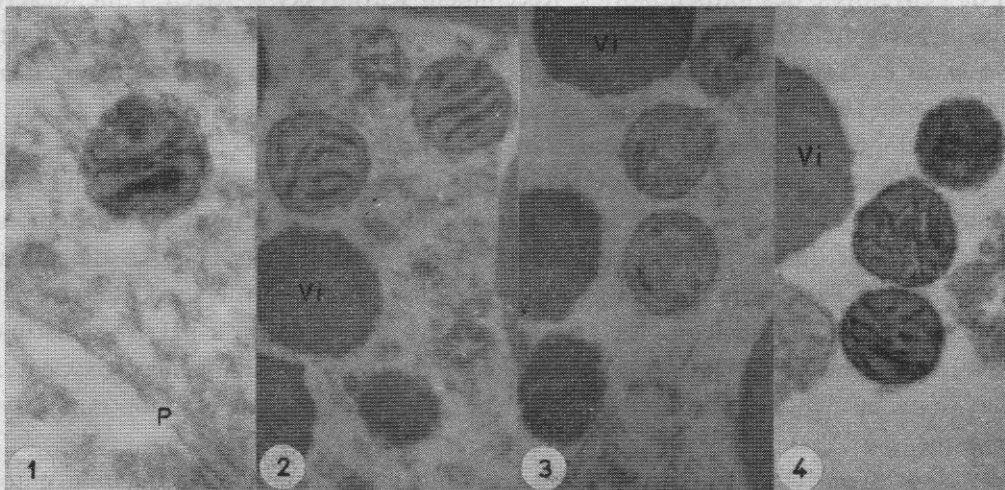


Fig. 1. — Ovocyte en prévitellogénèse ; 1 h de DAB. Réaction positive sur les membranes des crêtes mitochondriales et faiblement positive sur le feuillet interne de l'enveloppe. La membrane plasmique (P) et le feuillet externe montrent le même contraste ($G \times 72\,000$).

Fig. 2, 3 et 4. — Mitochondries d'œufs congelés, puis lavés et fixés ; incubation pendant 40 mn ($G \times 36\,000$).

— Fig. 2 : Congélation et lavage dans 11 % de sucrose. — Fig. 3 : Congélation dans 0,9 % de NaCl.

— Fig. 4 : Congélation dans 0,9 % de NaCl et incubation en présence de cytochrome *c* (Vi, plaquette vitelline).

Il est possible d'éliminer le cytochrome *c* des mitochondries par congélation-dégélation, suivie d'un lavage au NaCl à 0,9 % ⁽⁸⁾, procédé comparable à celui de Schneider, Claude et Hoogeboom [⁽¹⁵⁾, ⁽¹⁶⁾, ⁽¹⁷⁾]. Nous l'avons appliquée à des œufs non fixés ; l'addition de diméthylsulfoxyde à 10 % à la solution physiologique a permis de limiter l'effet nocif de la congélation ⁽¹⁸⁾. Il est apparu que la réaction mitochondriale à la DAB est fortement diminuée en comparaison avec les œufs traités de la même façon par le sucrose à 11 % au lieu de NaCl (fig. 2 et 3). Si du cytochrome *c* purifié de cœur de bœuf (Sigma) est ajouté au milieu d'incubation (1 mg/ml), le précipité dans les œufs traités au NaCl est de nouveau augmenté, et semble même remplir la matrice (fig. 4).

Il faut donc conclure que, dans l'ovocyte d'*Artemia*, le cytochrome *c* intervient tout comme son oxydase dans la réaction que nous avons étudiée ; l'on peut supposer

que la DAB soit oxydée directement par le ferricytochrome *c*, dont la forme réduite est ensuite oxydée grâce à son oxydase. Il en résulte que la DAB serait précipitée au site du cytochrome *c* ; l'addition de cytochrome *c* exogène au milieu d'incubation serait donc à déconseiller.

(*) Séance du 13 avril 1970.

(1) A. M. SELIGMAN, M. J. KARNOVSKY, H. L. WASSERKRUG et J. S. HANKER, *J. Cell Biol.*, 38, 1968, p. 1.

(2) M. J. KARNOVSKY et D. F. RICE, *J. Histochem. Cytochem.*, 17, 1969, p. 751.

(3) A. B. NOVIKOFF et S. GOLDFISCHER, *J. Histochem. Cytochem.*, 16, 1968, p. 507.

(4) A. B. NOVIKOFF et S. GOLDFISCHER, *J. Histochem. Cytochem.*, 17, 1969, p. 675.

(5) M. E. BEARD et A. B. NOVIKOFF, *J. Cell Biol.*, 42, 1969, p. 501.

(6) M. E. BEARD et A. B. NOVIKOFF, *J. Cell Biol.*, 43, 1969, p. 12 a.

(7) K. HIRAI, *Acta Histochem. Cytochem.*, 1, 1968, p. 43.

(8) M. M. NACHLAS, D. T. CRAWFORD, T. P. GOLDSTEIN et A. M. SELIGMAN, *J. Histochem. Cytochem.*,

6, 1958, p. 445.

(9) T. FLATMARK, *Acta Chemica Scand.*, 18, 1964, p. 2269.

(10) A. T. TU, J. A. REINOSA et Y. Y. HSIAO, *Experientia*, 24, 1968, p. 219.

(11) E. C. SLATER, *in* : Methods in Enzymology. Oxidation and Phosphorylation, Acad. Press, 10, 1957, p. 48.

(12) T. YONETANI, *in* : The Enzymes, P. D. Boyer, H. Lardy et K. Myrbäck, Acad. Press, 8, 1963, p. 41.

(13) T. YONETANI et G. S. RAY, *J. Biol. Chem.*, 240, 1965, p. 3392.

(14) T. E. KING, *in* : Hemes and Hemoproteins, Cytochrome *c* oxidase : discussion, B. Chance R. W. Estabrook et T. Yonetani, Acad. Press, 1966, p. 494.

(15) W. C. SCHNEIDER, A. CLAUDE et G. H. HOGEBOM, *J. Biol. Chem.*, 172, 1948, p. 451.

(16) R. W. ESTABROOK, *in* : Hemes and Hemoproteins, Enzymatic and spectral properties of various types of cytochrome, B. Chance, R. W. Estabrook et Y. Yonetani, Acad. Press, 1966, p. 405.

(17) J. REISS, *Mikroskopie*, 22, 1967, p. 1.

(18) J. FARRANT, *Nature*, 205, 1965, p. 1284.

(Laboratoire d'Anatomie, Faculté de Médecine
35, Ledeganckstraat, 9 000 Gand, Belgique.)